

AKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA FLAVONOID DARI TUMBUHAN PAKU PERAK (*Pityrogramma calomelanos*)

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FLAVONOID COMPOUND FROM SILVER FERN (*Pityrogramma calomelanos*)

Nurma Julita dan Suyatno*

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya
Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761*

*email: suyatno_kimunesa@yahoo.com

Abstrak. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri senyawa flavonoid dari ekstrak etil asetat bagian aerial tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, pemisahan dengan teknik kromatografi, pemurnian dengan rekristalisasi, penentuan struktur molekul dengan metode spektroskopi. Aktivitas antibakteri isolat flavonoid terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dilakukan dengan metode difusi cakram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat flavonoid yang diperoleh adalah 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi dihidrochalcon. Isolat tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri dengan kategori sedang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan zona hambatan masing-masing 18,43 mm dan 18,70 mm.

Kata-kata kunci: *Pityrogramma calomelanos*, flavonoid, antibakteri, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Abstract. The aim of research is to know the antibacterial activity of flavonoid from ethyl acetate extract of silver fern (*Pityrogramma calomelanos*). Extraction was carried out by maceration, separation by chromatography techniques, purification by recrystallization, determination of molecular structure by spectroscopic method. While antibacterial activity of isolat against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were determined using paper disk diffusion method. The results of research showed that flavonoid isolat obtained was identified as 2',6'-dihydroxy-4'-methoxy dihydrochalcon. It showed antibacterial activity in middle category with zone of inhibition of 18.43 mm and 18.70 mm, respectively.

Keywords: *Pityrogramma calomelanos*, flavonoid, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

PENDAHULUAN

Salah satu mikroorganisme yang berhubungan dengan bahan pangan dan manusia adalah bakteri. Bakteri terdapat sangat luas di lingkungan alam yang berhubungan dengan hewan, tumbuh-tumbuhan, udara, air, dan tanah. Pada kenyataannya, sedikit sekali lingkungan yang bersih terhadap bakteri. Menurut Pelczar dan Chain [1] Bakteri dapat menyebabkan

penyakit melalui makanan dengan dua cara yaitu infeksi dan keracunan (intoksikasi).

Bakteri dapat disingkirkan, dihambat, atau dibunuh dengan sarana atau proses fisik dan bahan kimia. Proses fisik merupakan suatu prosedur yang mengakibatkan perubahan, misalnya sterilisasi, pembakaran, dan sanitasi. Sementara itu, bahan kimia merupakan substansi (padat, cair, atau gas) yang dicirikan oleh komposisi molekular yang pasti dan

menyebabkan terjadinya reaksi, misalnya senyawa-senyawa fenolik, alkohol, klor, iodum, dan etilen oksida. Zat atau bahan yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri dikenal dengan bahan antibakteri [1]. Beberapa senyawa flavonoid, seperti jenis flavon, flavonol, dan flavanonon menunjukkan aktivitas antibakteri [2]. Aktivitas antibakteri dari isolat flavonoid juga telah dilaporkan oleh Cushnie & Andrew [3] dan Chhetri, *et al.* [4].

Salah satu contoh spesies tumbuhan paku yang telah dikenal adalah tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*). Tumbuhan tersebut banyak tumbuh di daerah-daerah terbuka, pada tempat yang berbatu di lereng-lereng bukit, dan pada bekas-bekas tembok tua, serta sering ditemukan di tepi sungai yang terbuka maupun yang agak terlindungi. Selain itu juga tumbuh subur baik di dataran rendah maupun di dataran tinggi dengan ketinggian 1200 m di atas permukaan laut [5].

Berdasarkan hasil penelitian fitokimia yang telah dilakukan, dari tumbuhan paku perak telah ditemukan senyawa metabolit sekunder golongan flavanoid yaitu 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi-dihidroalkon [6]. Uji bioaktivitas dari senyawa flavonoid tersebut belum banyak dilakukan. Oleh karena itu dalam upaya memberdayakan tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*) khususnya sebagai bahan alami antibakteri maka kami akan melaporkan hasil uji aktivitas antibakteri senyawa flavonoid 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi-dihidroalkon terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sebagai kelanjutan penelitian kami terhadap tumbuhan paku perak.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi seperangkat alat gelas, bejana maserasi, seperangkat alat penyaring Buchner, pompa vakum (Dreh schieber vakuum pumpe DSEZ), *rotary vacuum evaporator* (Heidolph laborata 4001), seperangkat alat kromatografi cair vakum, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, pelat tetes, pipa kapiler, Fisher John *melting point apparatus*, spektrofotometer UV (Pharma Spec-1700 Shimadzu), spektrofotometer FT-IR (Perkin Elmer), spektrometer massa (Shimadzu QP2010), lampu UV 254 dan 365 nm, cawan petri, tabung

reaksi, kawat ose, timbangan digital (OHAUS, Adventurer), tabung reaksi, kertas cakram (*paper disk*), Laminar flow (ESCO), oven (Heraeus), dan pembakar spiritus.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian meliputi serbuk kering bagian *aerial* tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*), etil asetat p.a. dan teknis, *n*-heksana p.a. dan teknis, kloroform p.a, metanol p.a, silika gel Merck G-60 (63-200 μ m), pelat KLT silika gel F₂₅₄ (20 x 20 cm; 0,25 mm), larutan FeCl₃ 5% dalam etanol, HCl pekat, pita magnesium, Muller Hinton agar (Oxoid), aquades, NaCl isotonis, ampicilin, bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) dan bakteri gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 51755).

Prosedur Penelitian

Isolasi

Sebanyak 500 gram serbuk kering bagian *aerial* tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*) diekstraksi dengan cara maserasi berturut-turut menggunakan pelarut *n*-heksana dan etil asetat selama 24 jam dan diulang 3 kali pada suhu kamar. Ekstrak etil asetat diuapkan dengan rotavapor menghasilkan ekstrak pekat berwarna hijau gelap (20,5 g). Uji kualitatif terhadap ekstrak menggunakan pereaksi FeCl₃ dan tes Shinoda (Mg + HCl) menunjukkan hasil positif yang masing-masing diindikasikan dengan terbentuknya warna kuning kehijauan dan kuning. Dengan demikian ekstrak positif mengandung senyawa fenolik golongan flavonoid.

Selanjutnya sebanyak 8 g ekstrak etil asetat dipisahkan dengan kromatografi cair vakum menggunakan eluen *n*-heksana, campuran *n*-heksana-etil asetat, dan etil asetat menghasilkan 120 fraksi. Hasil pemisahan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen *n*-heksana-etil asetat = 4 : 1. Gabungan fraksi 50-75 direkristalisasi berulang kali dalam benzena menghasilkan senyawa 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi dihidroalkon [1].

Pembuatan Media Muller Hinton Agar

Muller Hinton agar sebanyak 38 gram dilarutkan dalam 1 liter air suling kemudian dipanaskan di atas penangas air hingga jernih.

Selanjutnya media tersebut disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

Pembuatan Inokulum Bakteri

Biakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* masing-masing ditanam di permukaan Muller Hinton agar miring secara merata, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Satu ose koloni bakteri dari biakan padat disuspensikan ke dalam 5 ml larutan NaCl isotonis dan dikocok.

Penentuan Zona Hambatan

Sebanyak 1 ml inokulum bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri berdiameter 9 cm. Kemudian ke dalam cawan petri tersebut dimasukkan 15 ml larutan agar Muller Hinton steril suhu 45-50 °C. Campuran dibuat homogen dengan cara menggoyang-goyang cawan petri secara teratur dan selanjutnya dibiarkan menjadi padat. Kertas cakram (*paper disk*) berdiameter 0,5 inci yang telah dicelupkan ke dalam larutan isolat 1000 ppm diletakkan pada permukaan media agar dalam cawan petri. Posisi kertas cakram diatur agar tidak terlalu dekat dengan tepi posisi cawan petri. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Zona hambatan dari isolat ditentukan dengan mengukur diameter zona bening di sekeliling kertas cakram menggunakan jangka sorong. Dengan cara yang sama, juga dilakukan penentuan zona hambatan untuk antibiotik sintetik yakni ampicillin sebagai kontrol positif, serta dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

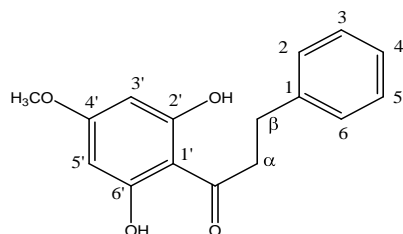
Penentuan Struktur Molekul Isolat Flavonoid

Dari ekstrak etil asetat bagian *aerial* tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*) telah berhasil dipisahkan senyawa flavonoid 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi dihidrocalkon [1] berupa kristal jarum berwarna kuning muda (205,3 mg) dengan titik leleh 169 – 171°C. Isolat menunjukkan satu noda pada kromatografi lapis tipis dengan tiga sistem eluen yakni $R_f = 0,86$ (kloroform-etil asetat = 9 : 1), $R_f = 0,44$ (*n*-heksana-etil asetat = 4 : 1), $R_f = 0,31$ (*n*-heksana-etil asetat = 9 : 1), serta satu puncak pada kromatogram hasil kromatografi gas dengan $R_t = 23,334$ menit. Spektrum UV (MeOH) λ_{maks} (log ϵ) : 285 (4,06) dan 336 (bh) (3,13) nm;

(MeOH + NaOH): 295 (3,86), 363 (bh) (3,44) nm; (MeOH+AlCl₃): 308 (4,42), 366 (bh) (3,36) nm; (MeOH+AlCl₃+HCl): 306 (4,20), 359 (bh) (3,50) nm; (MeOH+NaOAc): 286 (4,05), 339 (bh) (3,20) nm; (MeOH+NaOAc+H₃BO₃): 285 (4,05), 339 (bh) (3,20) nm. Spektrum IR (KBr) ν_{maks} : 3267 (OH), 3023 (C-H aromatik), 2968, 2938 (C-H alkil), 1647 (C=O terkelasi), 1597, 1529 (C=C aromatik), 1439, 1386, 1217, 1162 cm⁻¹. Spektrum EIMS, *m/z* : 272, 255, 177, 167, puncak dasar), 140, 136, 124, 111, 104, 9, 77, 69, 51, dan 39.

Titik leleh yang tajam dengan interval 2°C (169-171°C) menunjukkan bahwa isolat memiliki tingkat kemurnian yang tinggi. Hasil positif pada uji dengan pereaksi FeCl₃ dan tes shinoda (Mg + HCl) mendukung bahwa isolat merupakan senyawa golongan fenolik jenis flavonoid. Adanya gugus fenol juga didukung oleh munculnya puncak dalam spektrum IR pada daerah 3267,3 cm⁻¹ (vibrasi ulur OH) serta 1528,5 cm⁻¹ dan 1596,8 cm⁻¹ (vibrasi ulur C=C aromatik).

Hasil pengukuran spektrum UV isolat dalam pelarut metanol yang menunjukkan serapan maksimum pada λ_{maks} 284,80 nm (pita II) dan bahu pada daerah 335,75 nm (pita I), mendukung bahwa isolat merupakan flavonoid jenis dihidrocalkon [7]. Serapan OH (3267 cm⁻¹), C-H alkil (2968 cm⁻¹, 2938 cm⁻¹), C=O terkelasi (1647 cm⁻¹), C=C aromatik (1529 cm⁻¹, 1597 cm⁻¹) dalam spektrum IR mendukung bahwa isolat merupakan flavonoid jenis dihidrocalkon. Tidak adanya pergeseran batokromik yang berarti pada penambahan pereaksi NaOH dan NaOAc mendukung bahwa isolat tidak memiliki gugus OH bebas pada atom C-4'. Pergeseran batokromik pita II pada penambahan pereaksi AlCl₃ mendukung adanya gugus OH bebas pada C-6'. Penambahan pereaksi AlCl₃ + HCl dan NaOAc + H₃BO₃ tidak menyebabkan pergeseran batokromik pita II. Hal tersebut mendukung tidak adanya gugus orto-dihidroksi pada cincin A dalam isolat flavonoid. Hasil pengukuran spektrum massa menunjukkan bahwa isolat memiliki massa molekul relatif 272 yang sesuai untuk rumus molekul C₁₆H₁₆O₄. Berdasarkan hasil analisis data spektroskopi di atas maka isolat adalah senyawa 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi-dihidrocalkon.



[1]

Aktivitas Antibakteri Isolat Flavonoid

Uji aktivitas antibakteri isolat flavonoid dilakukan terhadap bakteri Gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 51755) dan bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925) menggunakan metode difusi cakram. Hasil pengujian disajikan dalam Tabel 1. Zona hambatan terkonversi dihitung menggunakan hasil penelitian dengan metode Stout [8].

Tabel 1. Aktivitas Antibakteri Isolat Flavonoid

No.	Bakteri Uji	Zona Hambatan (cm)	Zona Hambatan Terkonversi (mm)
1	<i>S. aureus</i>	1,8433	8,85
2	<i>E. coli</i>	1,8700	8,98

Berdasarkan Tabel 1 isolat flavonoid menunjukkan aktivitas antibakteri dengan zona hambatan terkonversi sebesar 8,85 mm dan 8,98 mm masing-masing untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Menurut Stout [8], suatu zat yang harga zona hambatannya antara 5-10 mm dikategorikan memiliki aktivitas antibakteri sedang. Dengan demikian isolat flavonoid senyawa 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi-dihidrochalcon memiliki aktivitas antibakteri yang tergolong sedang baik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* maupun *Escherichia coli*. Mengingat isolat tersebut menunjukkan aktivitas baik terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif, maka sifat antibakteri isolat tersebut dinyatakan berspektrum luas [1]. Dengan demikian isolat flavonoid tersebut memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai bahan antibakteri.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data maka dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi-dihidrochalcon hasil isolasi dari bagian *aerial* tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*) mempunyai aktivitas antibakteri dengan kategori sedang terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri Gram negatif *Escherichia coli*. Isolat tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan antibakteri.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada bapak Wardaya, S.P. dari LIPI Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur, yang telah membantu dalam identifikasi sampel tumbuhan paku perak (*Pityrogramma calomelanos*).

DAFTAR PUSTAKA

1. Pelczar, M.J dan Chan, E.C.S. 1988, *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jilid 1 & 2. Penerjemah Ratna, S.H, Teja, I.S., Sutarmi, T., dan Sri L.A. UI-Press, Jakarta.
2. Bylka, W., Matlawska, N. A. Pilewski. 2004, Natural Flavonoid as Antimicrobial Agents. *JANA*. 7 (2). 24-29.
3. Cushnie, T. P. & Andrew, J. L. 2005, Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26. 343-356.
4. Chhetri, H.P., Nisha, S.Y., Jyoti, S., Anupa, K.C, Mansoor. 2008, Phytochemical and Antimicrobial Evaluations of Some Medicinal Plants of Nepal. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering, and Technology*. 1 (5). 49-54.
5. Abdurahim, D. 2006, *Paku-Pakuan_Tugas Tanaman dan Sistem Ruang Terbuka Hijau*. http://www.freewebs.com/ar1_ipb_2006. Diakses tanggal 13 Desember 2011.
6. Suyatno, Hidajati, N., Effin, A.Y. 2009, Suatu Senyawa Dihidrochalcon dari Tumbuhan Paku Perak (*Pityrogramma calomelanos*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia, Jurusan Kimia FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya*.

7. Markham, K.R. 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerjemah Padmawinata, K., ITB, Bandung
8. Pasaribu, S.P., Eva, M., Bobby, S.N. 2008, Uji Fitokimia, Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Jarak Cina (*Jatropha multifida* L.). *Jurnal Kimia Mulawarman*. 5 (2). ISSN 1693-5616.